

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**SUŽIVOT VIRUSA I ČOVJEKA - HHV-1 I POTVRDA**  
**MIGRACIJSKIH PUTEVA SUVREMENOG ČOVJEKA**

---

**COEXISTENCE OF VIRUSES AND MAN – HHV1 AND**  
**CONFIRMING MIGRATION PATHS OF MODERN HUMANS**

**SEMINARSKI RAD**

Bruno Srezović Bijelić  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: prof. dr. sc. Dijana Škorić

Zagreb, 2017

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. MIGRACIJE SUVREMENOG ČOVJEKA .....	3
2.1. Egzodus iz Afrike .....	4
3. HERPESVIRUSI .....	7
3.1. Građa.....	8
3.2. HHV-1 .....	9
3.3. Latentna infekcija.....	11
4. PRAĆENJE MIGRACIJA PUTEM FILOGENETIKE HHV-1 .....	13
4.1. Molekularni sat .....	14
4.2. Rekombinacija.....	16
4.3. Značaj za praćenje migracija suvremenog čovjeka .....	18
5. LITERATURA .....	19
6. SAŽETAK .....	21
7. SUMMARY .....	21

# 1. UVOD

Otkrivanje podrijetla i rane povijesti ljudske vrste plijene pozornost znanstvene i šire javnosti od 19. stoljeća i širenja ideje evolucije. Fosilni ostaci suvremenog čovjeka i starijih hominida davali su naslutiti da je Afrika mjesto pojave čovjeka i njegovih predaka. No nepotpunost fosilnih ostataka i teškoće u njihovom datiranju zamagljivale su detalje o evolucijskom procesu koje je rezultirao suvremenim čovjekom, točne rute migracija kojima je naselio skoro sve kontinente Zemlje i njegov odnos s drugim hominidima.

Prije razvoja molekularnih metoda datiranja istraživači su se morali oslanjati na određivanje starosti fosila ili ljudskih alata pomoću radioaktivnih izotopa (najčešće ugljika  $^{14}\text{C}$ ). Nekompletnost većine fosilnih ostataka hominida i nepreciznost datiranja ostavila su mjesta sumnji i suprotstavljenim teorijama o mjestu i načinu postanka suvremenog čovjeka.

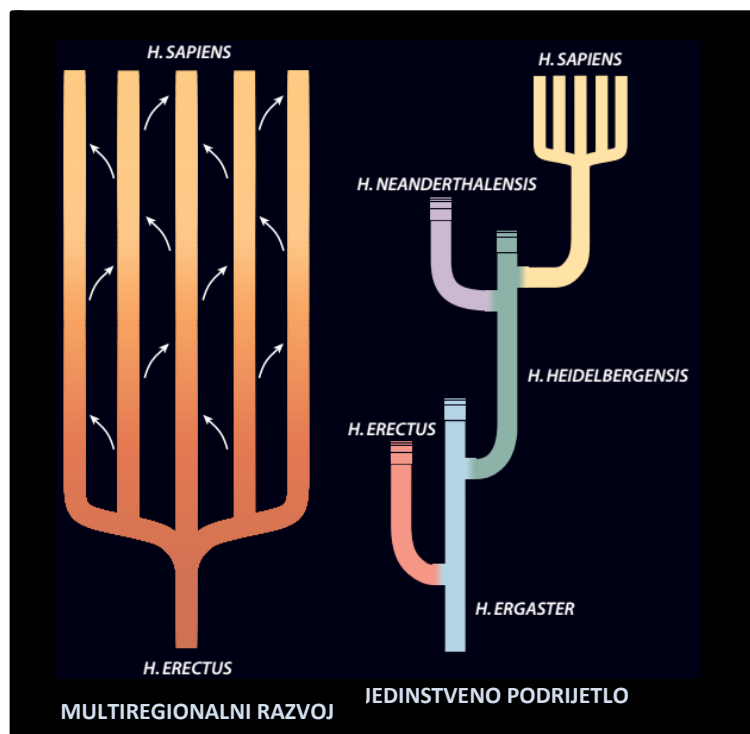
Razvoj metoda sekvenciranja biomolekula, sekvenciranje ljudskog genoma i razvoj ideje molekularnog sata omogućila su provjeru paleontoloških teorija iz genetičke perspektive. Istraživanja raznolikosti ljudske nuklearne DNA pokazale su najveću raznolikost unutar afričke populacije, što je u skladu s teorijama postanka suvremenog čovjeka u Africi. Primjena koncepta molekularnog sata na mikrosatelitnu DNA (Liu, 2006) i mitohondrijsku DNA (Cann i sur., 1987) rezultirala je skoro potpunim konsenzusom o jedinstvenom afričkom podrijetlu suvremenog čovjeka. Nedostaci ovih metoda su teškoće u procjeni stope mutacija za mitohondrijsku DNA (mtDNA) i mikrosatelitnu DNA, relativno niska stopa mutacija, utjecaj prirodne selekcije na rezultate i moguće miješanje suvremenih ljudi sa starijim hominidima.

Neke od ovih problema moguće je riješiti prelaskom s analize ljudskih na virusne DNA, tj. na proučavanje filogenetike i molekularnih satova virusa koji izazivaju perzistentne, cjeloživotne infekcije. Procjene stopa mutacija virusa su puno preciznije, a virusi koji izazivaju perzistentne infekcije i inficiraju znatan postotak populacije (JC virus 80%, herpes simplex virus 67%) mogu poslužiti kao surogatni biomarkeri za praćenje ljudskih migracija (<http://www.who.int>). Takvi virusi migriraju sa svojim domaćinima, a sekvenciranje njihovih genoma znatno je jednostavnije od provođenja istog postupka na ljudskoj jezgri ili mitohondrijskoj DNA.

## 2. MIGRACIJE SUVREMENOG ČOVJEKA

Afrika je izvorište evolucije svih hominida. Preci suvremene vrste *Homo sapiens* periodično su napuštali Afriku te kolonizirali ostale kontinente. Iako je zbog nepouzdanosti djelomičnih fosila nejasno je li Afriku prvo napustio *Homo erectus* ili neki stariji pripadnik *Hominidae*, datiranje ugljikom i druge metode (npr. datiranje Argonom) pokazuju da je *H. erectus* kolonizirao dijelove Azije i Europe prije 1,9 milijuna godina.

Postanak modernog čovjeka objašnjavaju dvije suprotstavljene teorije. Teorija multiregionalnog razvoja postulira da je moderan čovjek potekao izravno iz vrste *H. erectus*, točnije da je razvoj tekao usporedno u više regija između kojih je dolazilo do kontinuirane razmjene gena (dakle radi se o evoluciji unutar jedne vrste, bez specijacije). Nasuprot tome teorija jedinstvenog afričkog podrijetla konstatira da je evolucija modernog čovjeka tekla kroz nekoliko specijacijskih događaja te da su te srodne vrste roda *Homo* migrirale iz Afrike u više navrata (Slika 1.).



**Slika 1.** Sukobljene teorije o evoluciji modernog čovjeka (preuzeto i prilagođeno na temelju Tattersall, 1997).

Većina aktualnih saznanja o evolucijskim procesima i fosilni nalazi daju teoriji o jedinstvenom afričkom podrijetlu (poznata i pod imenom “Egzodus iz Afrike”) prednost pri suvremenim paleoantropološkim razmatranjima (Tattersall, 2009).

## **2.1. Egzodus iz Afrike**

Prema ovoj teoriji moderni čovjek evoluirao je na području istočne Afrike prije 100-200 tisuća godina. Teorija jedinstvenog afričkog podrijetla potkrijepljena je i istraživanjima ljudske mitohondrijske DNA. Usporedbom mitohondrijske DNA ljudi i čimpanzi, uz fosilnim nalazima potkrijepljenu pretpostavku da su ljudi i čimpanze divergirali od zajedničkog pretka prije otprilike 5 milijuna godina, utvrđena je stopa mutacija ljudske mtDNA na  $1,7 \cdot 10^{-8}$  supstitucija po mjestu na godinu. (Witas, 2004). Na temelju stope mutacije može se formirati tzv. molekularni sat, jer ako poznajemo stopu mutacije nekog gena i pretpostavimo da je ta stopa uglavnom konstantna, tada možemo utvrditi koliko je vremena prošlo od divergencije dvaju različitih sljedova istog gena.

Usporedbom mitohondrijskih haplotipova koji su specifični za određenu geografsku regiju i primjenjivanjem molekularnog sata mogu se utvrditi približna vremena migracija suvremenog čovjeka. Analiza mtDNA ukazuje na afričko podrijetlo suvremenog čovjeka (Slika 2). Najstarije divergencije u mtDNA (L1-3) dominiraju subsaharskom Afrikom, koja je mjesto najveće raznolikosti sljedova mtDNA i stoga najvjerojatnija “kolijevka” suvremenog čovjeka.



**Slika 2.** Rute migracija suvremenog čovjeka deducirano na temelju uzoraka moderne mtDNA (Preuzeto iz Witas, 2004).

Kolonizacija Azije je tekla u dva vala, jedan sjevernom rutom uz obalu Sredozemlja, a drugi južnom rutom uz obalu indijskog oceana. Važno je napomenuti da je raznolikost haplotipova hipotetske južne rute migracije (M na slici 2) manja u području Etiopije naspram raznolikosti u Indiji. Stoga postoji mogućnost da su haplotipovi grupe M zapravo povratna migracija iz Indijskog poluotoka u Afriku. Međusobna sličnost mtDNA u suvremenih stanovnika Europe upućuje na samo jedan kolonizacijski događaj tijekom Paleolitičke ekspanzije (~50 000 godina), uz nekoliko malobrojnih haplotipova koji migriraju na prostor Europe u ranom neolitiku (~10 000 godina).

Analiza mtDNA potvrđuje dosadašnje shvaćanje da je prvo naseljavanje Sjeverne Amerike poteklo s prostora sjeverne Azije preko potpuno ili djelomično zaleđenog Beringovog prolaza. Populacije Američkih Indijanaca i Inuita genetički su najbližnje stanovnicima

Čukotskog poluotoka. Bliskost američkih haplotipova ukazuje na samo jedan val migracija (Witas,2005).

Bitno je napomenuti da se vremena divergencije mitohondrijskih haplotipova ne moraju poklapati sa stvarnim razdobljem naseljavanja novog prostora. Raznolikost u haplotipu mogla je nastati puno ranije, te potom efektom osnivača preuzeti primat na novom području. Također, nestanak haplotipa u jednoj populaciji putem genetskog drifta može zamagliti pravu sliku o smjerovima migracija. Preciznije datiranje migracija suvremenog čovjeka i rješavanje pitanja vezanih uz moguće križanje s pripadnicima starijih porodica hominida i danas su goruća pitanja u paleoantropologiji.

### 3. HERPESVIRUSI

Herpesvirusi (*Herpesviridae*) su porodica velikih DNA virusa koji inficiraju širok raspon domaćina. Dosad je izolirano preko 100 različitih herpesvirusa iz sisavaca, ptica, riba, vodozemaca i mekušaca. Herpesviruse dijelimo u 3 potporodice na temelju svojstava infekcije; *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* i *Gammaherpesvirinae*. Među njima je utvrđeno devet ljudskih herpesvirusa (Tablica 1).

**Tablica 1.** Podjela ljudskih herpesvirusa (talk.ictvonline.org).

POTPORODICA	VALIDNO IME/KOLOKVIJALNO IME	BOLEST
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Human alphaherpesvirus 1</i> (HHV-1) / virus herpes simplex tipa 1 (HSV-1)  <i>Human alphaherpesvirus 2</i> (HHV-2) / virus herpes simplex tipa 2 (HSV-2)  <i>Human alphaherpesvirus 3</i> (HHV-3) / virus varicella-zoster (VZV)	gingivostomatitis, egzem, keratokonjunktivitis, encefalitis, <i>herpes labialis</i>  genitalni i neonatalni herpes  <i>varicella</i> (vodene kozice), zoster
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Human betaherpesvirus 5</i> (HHV-5) / citomegalovirus (CMV)  <i>Human betaherpesvirus 6A</i> (HHV-6A) <i>Human betaherpesvirus 6B</i> (HHV-6B) <i>Human betaherpesvirus 7</i> (HHV-7) / herpesvirus tipa 7	mononukleoza; infekcije oka, bubrega, mozga i ploda  <i>exanthema subitum</i> <i>exanthema subitum</i> <i>exanthema subitum</i>
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Human gammaherpesvirus 4</i> (HHV-4) / Epstein-Barr virus (EBV)  <i>Human gammaherpesvirus 8</i> (HHV-8) / herpesvirus tipa 8	infektivna mononukleoza, Burkittov limfom, nazofaringealni karcinom Kaposijev sarkom

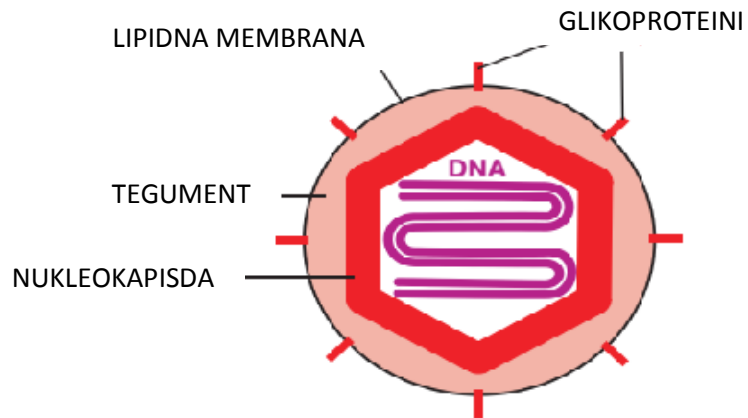


Viruse potporodice *Alphaherpesvirinae* karakterizira kratko trajanje ciklusa umnožavanja, brzo rasprostranjivanje među stanicama u kulturi i razaranje inficiranih stanica. Virusi potporodice *Betaherpesvirinae* ne razaraju inficirane stanice (nisu citocidni) već se one uvećavaju (citomegalija). Ovi virusi sporije se šire kroz kulturu. Članovi potporodice *Gammapherpesvirinae* mogu se umnožavati samo u limfoblastoidnim stanicama te uglavnom uzrokuju kronične infekcije stanica limfnog tkiva (Presečki, 1994).

Zajednička karakteristika svih potporodica herpesvirusa je izazivanje latentnih infekcija u domaćinu koje u većini slučajeva traju cijeli život. Reaktivacija latentnog virusa vodi ka ponovnoj pojavi bolesti. Primjeri su rekurentna pojava tekućinom ispunjenih mjehurića na epitelu usnica pri infekciji s HHV-1. Zanimljiva je i infekcija virusom varicella-zoster koji pri primarnoj infekciji izaziva bolest *varicella* (vodene kozice), a potom ostaje dormantan u trigeminalnom gangliju i ganglijima stražnjih (dorzalnih) ogranaka moždinskih živaca. Nakon aktivacije virus izaziva bolest koju nazivamo herpes zoster ([www.who.int](http://www.who.int)).

### 3.1. Građa

Virioni herpesvirusa sastoje se od proteinske nukleokapside, tegumenta i lipidne ovojnice (Slika 3). Nukleokapsida je ikozaedar triangulacijskog broja  $T=16$ , sastavljena od 6 različitih proteina. Strukturni proteini nukleokapside herpesvirusa raspoređeni su u 162 kapsomere (12 pentamera i 150 heksamera). Nukleokapsida je okružena tegumentom (virusne matriksom) koji se sastoji od minimalno 14 proteina, a ponekad sadrži i virusne mRNA molekule (Carter i Saunders, 2007).



**Slika 3.** Struktura viriona HHV-1( preuzeto i prilagođeno na temelju Carter i Saunders, 2007).

Tegument je obavijen lipidnim dvoslojem iz kojeg prodiru glikoproteini.

Virusni genom je linearna DNA molekula koja varira veličinom od 125 do 250 parova baza unutar ove porodice. Virusnu DNA prepisuje stanična RNA polimeraza II.

### 3.2. HHV-1

HHV-1 pripada potporodici *Alphaherpesvirinae* te pokazuje građu tipičnu za sve herpesviruse. Genom virusa sastoji se od 152 000 parova baza, sa 68% udjela GC (gvanozin i citozin). Dvolančana linearna DNA ovog virusa ima specifičnu strukturu; sastoji se od dva dijela koji su okruženi obrnutim ponavljanjima nukleotida (Slika 4).



U: neponavljajući dio genoma

R: ponavljajuća sekvenca

L: dugo S: kratko

T: terminalno I: obrnuto

**Slika 4.** Struktura virusne DNA HHV-1 (preuzeto i prilagođeno na temelju Carter i Saunders, 2007.).

Genom HHV-1 kodira 74 proteina, od kojih su neki kodirani sljedovima u obrnutim ponavljanjima genoma (u genomu virusa ovi geni se nalaze u dvije kopije jer su oba lanca transkripcijski aktivna). Domaćin virusa je primarno čovjek, ali u kulturi je moguće inficirati stanice drugih sisavaca. Ulazak u stanicu započinje vezanjem glikoproteina ovojnice na heparan sulfat na površini stanice, a potom i na glavni receptor (vjerojatno jedan od nektina). Nakon fuzije s membranom tegument i nukleokapsida otpuštaju se u citoplazmu. Proteini tegumenta imaju različite funkcije poput regrutiranja domaćinske RNA polimeraze do degradiranja staničnih mRNA molekula. Nukleokapsida se prenosi do jezgre aktivnim kretanjem uz mikrotubule (Lee, 2006). Virusna DNA se prenosi u jezgru kroz nukleoporu te se prepisuje staničnom RNA-polimerazom II.

Geni virusa eksprimiraju se u tri faze;  $\alpha$  (neposredna rana faza – većinom transkripcijski faktori),  $\beta$  (rana faza – geni odgovorni za replikaciju virusne DNA) i  $\gamma$  (kasna faza – strukturni geni virusnih čestica). Virusna DNA isprva se replicira  $\theta$  replikacijom, a kasnije prelazi u  $\sigma$  replikaciju (replikaciju kotrljajućeg kruga) koja rezultira stvaranjem konkatemera (dugih DNA-molekula koje sadrže mnogo kopija DNA) (Acheson, 2011). Izlazak formiranih viriona iz inficirane stanice izaziva staničnu smrt, što je tipično za sve članove potporodice *Alphaherpesvirinae*.

### 3.3. Latentna infekcija

Uspostavljanje latentnih infekcija je svojstvo većine herpesvirusa, pa tako i HHV-1. Virus se razmnožava i lizira mukozne i epitelne stanice kože i usnica. Virusno potomstvo može zaraziti okolna živčana vlakna povezana s osjetom bola (vlakna tipa C). Virus u neuronima ulazi u fazu latencije. Kontrola uspostave i održavanja latencije nije u potpunosti razjašnjena. Jedno od mogućih objašnjenja oslanja se na strukturne razlike između neurona i epitelne stanice. Pri ulasku u epitelne stanice nukleokapsida dolazi do jezgre te ispušta u nju DNA dok protein tegumenta VP16 (koji je otpušten u citoplazmu pri prolasku kroz staničnu membranu) veže domaćinske transkripcijske faktore (Oct-1 i HCF-1) i omogućuje transkripciju gena za  $\alpha$ -proteine. Nasuprot tome u neuronima nakon infekcije nukleokapsida mora biti prenesena preko nekoliko redova veličine veće udaljenosti aktivnim pomicanjem po mikrotubulima (protein VP26 je odgovoran za dineinima sličnu aktivnost kretanja uz mikrotubule). Za razliku od nukleokapsida proteini tegumenta pa tako i VP16 kroz citoplazmu se prenose pasivno, difuzijom. Zbog toga je moguće da u dugim stanicama neurona pri infekciji ne dospije dovoljno proteina tegumenta VP16 do jezgre, te stoga ne može započeti transkripcija većine virusnih gena. Stanice ljudskih neurona sadrže i transkripcijske faktore koji se vežu na transkripcijski faktor HCF-1 (dio specifične kontrole ciklusa u živčanim stanicama) te time inhibiraju inicijaciju virusne transkripcije putem VP16.

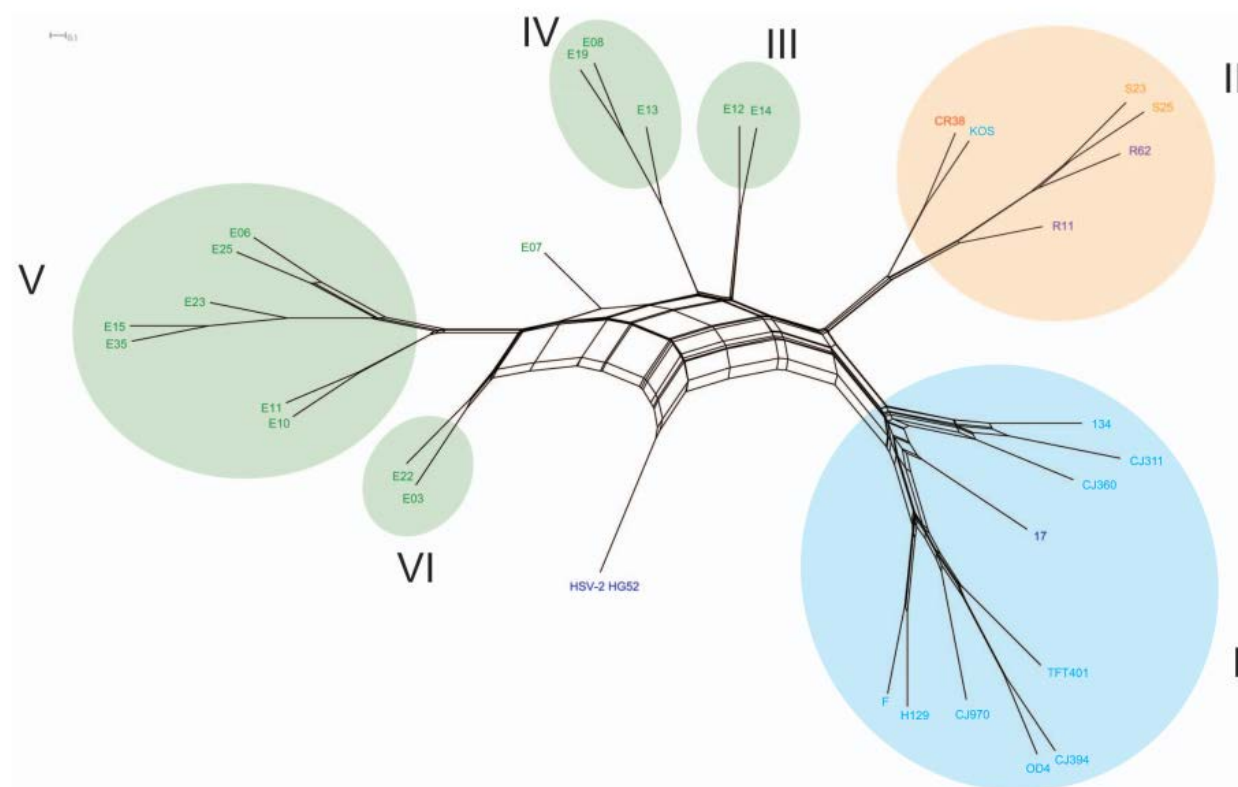
Iako ovi mehanizmi sprječavaju prepisivanje većine virusnog genoma on ipak nije u potpunosti neaktivan. Pri latentnoj infekciji dolazi do prepisivanja klase virusnih RNA-molekula, tzv. LAT (Latency Associated Transcripts). Značaj LAT-ova nije u potpunosti razjašnjen. Moguće je da inhibiraju proizvodnju virusnih proteina mehanizmom *antisense* RNA. Neke od ovih RNA formiraju stabilne strukture unutar jezgre slične lariatima koji nastaju tijekom posttranskripcijskog uređivanja eukariotskih mRNA. Istraživanja su pokazala da LAT-ovi nisu nužni za održavanje latencije, ali smanjuju produktivnost infekcije u nekim kulturama stanica te blokiraju proces apoptoze (Acheson, 2011).

Mehanizam reaktivacije virusa također nije u potpunosti razjašnjen. Ponovna pojava bolesti u ljudi može biti izazvana stresom, hipertermijom, izlaganjem ultraljubičastom svjetlu itd. Takvi uvjeti izazivaju ispuštanje CGRP-a (*calcitonine gene related peptide*) iz živčanih vlakana tipa C. Nakon što se potroše rezerve CGRP-a neuroni moraju aktivirati transkripciju

kako bi proizveli CGRP i druge potrebne neuropeptide. Pretpostavlja se da ova aktivacija transkripcije staničnih gena može ukloniti ili oslabiti blokadu transkripcije virusnih gena. Novoformirane nukleokapside se potom prenose niz živčano vlakno istim mehanizmom kao i pri prvoj infekciji (Becker, 2002).

#### 4. PRAĆENJE MIGRACIJA PUTEM FILOGENETIKE HHV-1

Nove metode sekvenciranja genoma i dostupnost genomskih sljedova na javno dostupnim bazama podataka (GenBank) omogućile su preciznije određivanje filogenije HHV-1-a. Usporedbom 31-og kompletnog ili skoro kompletnog uzorka cijelog genom virusa prikupljenih u Europi, Sjevernoj Americi, Istočnoj Aziji i istočnoj Africi (Etiopija) konstruirano je filogenetsko stablo HHV-1 (Kolb, 2013). Uspoređivanjem cijelih genoma i konstruiranjem filogenetskog stabla metodom najveće vjerojatnosti utvrđeno je postojanje minimalno 6 skupina ovog virusa. (Slika 5).



**Slika 1** Filogenetsko stablo HHV-1, rimskim brojevima označeni su različite skupine. Boje mjehurića odgovaraju geografskom podrijetlu skupina (zelena-istočna Afrika, plava - Sjeverna Amerika i Europa, žuta – istočna Azija). Boja oznake samih sojeva odgovara zemlji podrijetla (svijetlo plava – SAD, tamno plava – UK, zelena – Kenija, crvena – Kina, narančasta – Japan i ljubičasta – Južna Koreja). (Preuzeto iz Kolb, 2013).

Kao vanjska grupa za filogenetičku analizu korišten je genom HHV-2, također preuzet s javne baze podataka GenBank. Određena je srednja genetička udaljenost između HHV-1 i HHV-2 (23.6%), kao i srednja genetička udaljenost između 31-og uzorka HHV-1 (0.8%).

Usporedba mjesta uzimanja uzorka s dobivenim filogenetskim stablom dovelo je do sljedeće geografske razdiobe ovih skupina; četiri u Etiopiji, jedan u istočnoj Aziji te jedna skupina koja obuhvaća Sjevernu Ameriku i Europu. Od 31-og obrađenog genoma 30 ih se uklapa u ovu geografsku podjelu. Jedina iznimka je soj oznake KOS koji je genetički najbliži istočnoazijskoj grupi, a prikupljen je u Sjevernoj Americi. Moguća objašnjenja za odstupanje ovog soja je da je uzorak virusa prikupljen iz populacije Američkih Indijanaca (koji su naselili Sjevernu Ameriku migracijom kopnenim putem iz Azije prije 20000 g.) ili da je neobičnost ovog uzorka rezultat nedavnih putovanja.

#### **4.1. Molekularni sat**

Kako bi mogli koristiti razdvajanja populacija HHV-1 kao aproksimaciju vremena razdvajanja domaćinskih ljudskih populacija nužno je uspostaviti molekularni sat. Molekularni sat je kao hipoteza predložen od strane Linusa Paulinga i Emila Zuckerkandla 1962. Ta dva znanstvenika pretpostavila su da je brzina promjene aminokiselinskog slijeda globinskih proteina kralježnjaka konstantna. Uzeli su kao pretpostavku da su ljudi i konji divergirali prije 100 do 160 milijuna godina (na temelju datiranja fosila) te potom iz te pretpostavke izračunali brzinu supstitucija. Pomoću tako kalibriranog molekularnog sata odredili su vrijeme divergencije ljudi i gorila na 11 milijuna godina. (Ho, 2008). Pronalazak velikog broja dokaza o nejednakosti u stopama varijacija među sojevima dovelo je do razvoja “opuštenih” molekularnih satova koji dopuštaju varijacije u stopama mutacija.

Kalibracija molekularnog sata nužan je korak u svakom pokušaju datiranja evolucijskih događaja promatranjem genoma danas živućih vrsta. Promatranje razlika nekoliko srodnih gena/genoma možemo samo zaključiti srodstvene odnose, tj. konstruirati filogenetsko stablo. Odnosi duljina grana filogenetskog stabla mogu biti bliski stvarnosti (možemo zaključiti da su dvije vrste dvostruko srodnije, da su divergirale dvostruko ranije naspram neke treće promatrane vrste), ali bez poznavanja stope mutacije promatranog gena nije moguće odrediti točan vremenski raspon promatranih evolucijskih događaja. Zato je kod promatranja molekularnih satova gena kojima je teško utvrditi stopu mutacije (zbog relativno dugog vremenskog raspona u kojem se dogodi statistički značajan broj mutacija i dugog generacijskog vremena) uobičajeno

kalibrirati molekularni sat vremenom jednog od promatranih evolucijskih događaja (običaj je izabrati onaj koji je najbolje poduprt fosilnim nalazima, tj. najstariji od više fosila iste vrste).

U slučaju datiranja pomoću molekularnih satova virusa moguće je odrediti brzinu sata jer virusi imaju relativno brze stope mutacija i repliciraju se i do nekoliko bilijuna viriona tijekom jedne infekcije. Pri istraživanju HHV-1 (Kolb, 2003) kao potencijalnog biomarkera za ljudske migracije uzet je u obzir raspon stope mutacija virusa dobiven trima prošlim istraživanjima (redom  $1.82 \cdot 10^{-8}$ ,  $3 \cdot 10^{-8}$  i  $3 \cdot 10^{-9}$  supstitucija po mjestu po godini). Kako bi preciznije utvrdili stopu mutacija provedena je analiza BEAST (“Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees”) softverom koji iz ranije spomenutog raspona ( $\pm 10\%$ ) mogućih stopa mutacija (i vremenskog raspona jednog od evolucijskih događaja na kreiranom filogenetskom stablu (odabrano je razdvajanje europske i azijske populacije datirano fosilnim i genetičkim metodama na prije  $34000 \pm 10500$ ) određuje statistički najvjerojatniju srednju stopu mutacija. Ovom metodom stopa mutacija HHV-1 postavljena je na  $1,38 \cdot 10^{-7}$  supstitucija po mjestu po godini te su tako kalibriranim molekularnim satom datirana razdvajanja virusnih (a posljedično i ljudskih) linija (Tablica 2).

**Tablica 2** Usporedba vremena procijenjenih razdvajanja virusnih populacija s približnim vremenima razdvajanja ljudskih populacija (preuzeto iz Kolb, 2013).

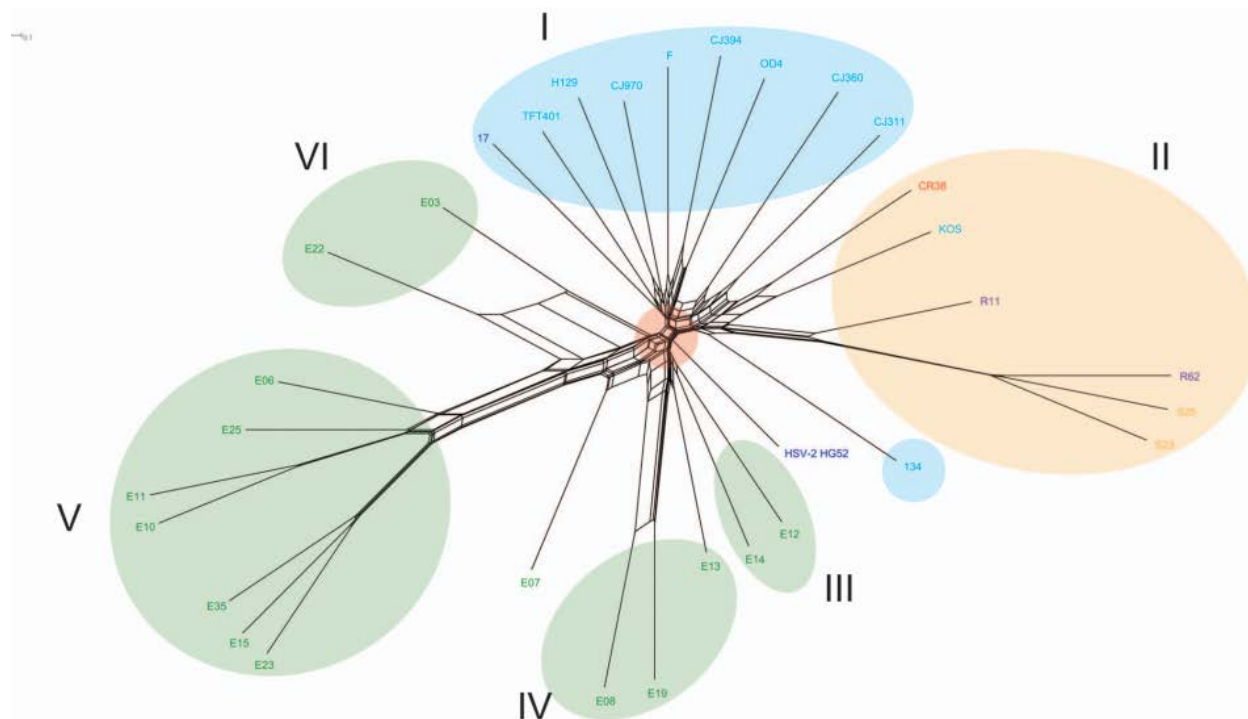
DIVERGIRAJUĆI VIRUSNI SOJEVI	tMRCA (vrijeme do najbližeg zajedničkog pretka)	LJUDSKA MIGRACIJA
HHV-1 i HHV-2	$2.184 \pm 0.753$ milijuna godina	približno pojava roda <i>Homo</i> (2-3 milijuna godina)
sojevi HHV-1	$50.3 \pm 16.7$ tisuća godina	migracija iz Afrike (prije 60 tisuća godina)
euroazijski sojevi	$32.8 \pm 10.9$ tisuća godina	razdvajanje na azijsku i europsku populaciju (20-30 tisuća godina)
KOS i CR38	$15.76 \pm 65.3$ tisuća godina	naseljavanje Amerika (12-20 tisuća godina)



## 4.2. Rekombinacija

Rekombinacija virusne DNA moguća je između DNA virusa istog soja ili tijekom istovremene infekcije domaćina s dva ili više sojeva istog ili srodnog virusa. Podaci o rekombinacijskim događajima između sojeva virusa mogu dati dodatne informacije o dinamici migracija domaćina. Mehanizam virusne rekombinacije HHV-1 nije u potpunosti razjašnjen. Virus herpesa kodira proteine (UL12 i ICP8) koji su analogni Red $\alpha$  $\beta$  proteinima za rekombinaciju bakteriofaga  $\lambda$  (Wilkinson, 2003). Studije in vitro na HHV-1 pokazale su visoku stopu rekombinacije pri superinfekciji s različitim sojevima virusa no to ne implicira da je stopa rekombinacije u prirodi jednako visoka. Mnoga svojstva infekcije herpesvirusima negativno utječu na mogućnost rekombinacije; virusna replikacija je ograničena na mjesto infekcije, virus se ne rasprostranjuje kroz tijelo domaćina, nakon uspostave latentne infekcije virus je lokaliziran u samo nekoliko senzornih živaca te je koinfekcija istog neurona malo vjerojatna. Imunosni sustav osobe koja je latentno inficirana herpesom u većini slučajeva proizvodi protutijela na virusne glikoproteine, a latentni virusi proizvode LAT-ove i glikoprotein D koji smanjuju mogućnost produktivne superinfekcije. Herpes se prenosi intimnim kontaktom te je transmisija stoga interfamilijarna što također smanjuje mogućnost rekombinacije između evolucijski udaljenih sojeva (Kolb, 2013).

Svi navedeni razlozi čine studije in vitro neučinkovitim alatom za proučavanje mogućih rekombinacija sojeva HHV-1 koje bi mogle utjecati na praćenje migracija suvremenog čovjeka putem filogenetike tog virusa. U svojem radu iz 2013. Kolb, Ane i Brandt primijenili su novi statistički pristup proučavanju virusne rekombinacije. Prikupljeni genomi razdvojeni su na manje dijelove te je za svaki dio metodom ML (eng. maximum likelihood – najveća vjerojatnost) generirano 500 mogućih filogenetskih stabala. Dobivena stabla tih particija potom su spojena u jednu mrežu (Slika 6) koja prikazuje statistički vjerojatne rekombinacije spojnica grana koje predstavljaju zasebne sojeve. Ovakva mreža opravdava teoriju jedinstvenog afričkog podrijetla, vidljivo iz rekombinacijskog uskog grla (crveni krug, Slika 6).



**Slika 2** Mreža konstruirana spajanjem partijskih filogenetskih stabala genoma HHV-1. Vidimo sličnu topologiju kao i na slici 5, većina rekombinacijskih događaja koncentrirana je uz bazu stabla gdje je vidljivo rekombinacijsko usko grlo između Euroazijskih i Afričkih skupina (preuzeto iz Kolb, 2013).

Rezultati obrade podataka pokazuju da rekombinacije između različitih skupina HHV-1 nisu česta pojava. Iznimke uključuju rekombinacije između odvojenih afričkih skupina (objašnjivo manjim, interkontinentalnim migracijama i miješanjem populacija) i rekombinaciju između azijskog soja CR38 i soja KOS (izoliranog u SAD-u ali s pripadnošću azijskoj skupini). Ako je soj KOS uistinu izoliran iz populacije Američkih Indijanaca tada je ta rekombinacija dodatni dokaz naseljavanja američkih kontinenata iz Azije preko sjeverne rute. Većina mogućih rekombinacija opažena je unutar bliskih sojeva ili vrlo rano pri razilaženju sojeva (pri korijenu mreže). Ovakvi rezultati sugeriraju da rekombinacija nije otežavajući faktor pri praćenju migracija pomoću HHV-1.

### 4.3. Značaj za praćenje migracija suvremenog čovjeka

S obzirom na malen broj uzoraka i nepostojanje podataka o etnicitetu osoba iz koje je uzorak prikupljen ovu podjelu na 6 skupina moramo uzeti kao minimalnu aproksimaciju prave raznolikosti virusa HHV-1 u ljudskoj populaciji. Znatnim povećanjem broja i geografske raznolikosti uzoraka u nekom skorijem istraživanju vjerojatno će se povećati i broj poznatih skupina virusa. Buduća istraživanja HHV-1 kao biomarkera za praćenje ljudskih migracija trebala bi zabilježiti etnicitete osoba koje su bili nositelji tih virusa kako bi izbjegli nedoumice u interpretaciji rezultata.

Virusi imaju prednost nad mtDNA i ljudskom jezgrinom DNA kao biomarkera za datiranje relativno nedavnih ljudskih migracija zbog mnogo bržih stopa mutacija koje omogućuju veću razlučivost pri datiranju migracija (broj promjena u genomu nije dovoljno velik kroz razdoblje od interesa). Valja napomenuti da su moguća iznimka istraživanja ljudske mikrosatelitne DNA koja ima višu stopu mutacija od ostatka genoma (Liu, 2006). Ipak, analiza virusnih genoma je jeftinija te ih je lakše izolirati.

Prijašnja istraživanja filogenetike virusa JC (Pavesi, 2005) pokazala su da i taj virus ima geografski razdvojene filogenetske skupine te da može biti korišten za praćenje migracija. HHV-1 ima skoro 30 puta veći genom (152,000 pb HHV-1 naspram 5,130 pb JCV) ([www.microbewiki.kenyon.edu](http://www.microbewiki.kenyon.edu)) što omogućuje preciznije genetičko mapiranje i točnije datiranje zbog većeg broja polimorfizama jednog nukleotida (SNP-ova) po genomu.

## 5. LITERATURA

- Acheson N.H., 2011. Fundamentals of molecular virology. John Wiley & sons, Inc. 285-302
- Becker, Y., 2002. Herpes simplex virus evolved to use the human defense mechanisms to establish a lifelong infection in neurons – A review and hypothesis. *Virus Genes* 24, 187-196
- Cann, R.L., Stoneking, M., Wilson A.C., 1987. Mitochondrial DNA and human evolution, *Nature* 325, 31-36
- Carter, J., Saunders V., 2007. Virology principles and applications. John Wiley & sons, Ltd- 121-135
- Kolb, A.W., Ane, C., Brandt, C.R., 2013. Using HSV-1 genome phylogenetics to track past human migrations. *PLoS ONE* 8(10) e76267
- Kolb, A.W., Adams, M., Cabot, E.L., Craven, M., Brandt, C.M., 2003. Multiplex sequencing of seven ocular herpes simplex virus type-1 genomes: phylogeny, sequence variability, and SNP distribution. *Investigative ophthalmology & visual science* 52, 9061-9072
- Lee, G.E., Murray, J.W., Wolkoff, A.W., Wilson, D.W., 2006. Reconstitution of herpes simplex virus microtubule-dependent trafficking in vitro. *Journal of Virology* 80, 4264-4275
- Lee, S.Y.M., Ho, Y.W.S., 2008. Molecular clocks. *Current biology* 26, 399-402
- Liu, H., Prugnolle, F., Manica, A., Balloux, F., 2006. A geographically explicit genetic model of worldwide human-settlement history. *The american journal of human genetics* 79, 230-237
- Pavesi, A., 2005. Utility of JC polyomavirus in tracing the pattern of human migrations dating to prehistoric times. *Journal of general virology* 86, 1315-1326
- Presečki, V., 1994. Virologija, Školska knjiga, Zagreb. 107-112
- Tattersall, I., 2009. Human origins: Out of Africa. *PNAS*(106) 38 16018-16021
- Tattersall, I., 1997. Out of Africa again... and again? *Scientific American* 276, 60-67
- Wilkinson, D.E., Weller, S.K., 2003. The role of DNA recombination in herpes simplex virus DNA replication. *Life*, 55, 451–458
- Witas, H.W., Zawicki, P., 2004. Mitochondrial DNA and human evolution: A review. *Anthropological review* 67, 97-110
- [talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/6776](http://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/6776)

[www.microbewiki.kenyon.edu/index.php/Human\\_JC\\_Polyomavirus](http://www.microbewiki.kenyon.edu/index.php/Human_JC_Polyomavirus)

<http://www.who.int/biologicals/vaccines/varicella/en/>

[www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/herpes/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/herpes/en/)

## 6. SAŽETAK

Podrijetlo suvremenog čovjeka je već stoljećima predmet ljudskog zanimanja. Otkapanje i datiranje fosila radiografskim i stratigrafskim metodama je do nedavno bilo jedini način traženja odgovora na pitanja o smjerovima ranih ljudskih migracija i razdobljima u kojima su se one zbivale.

Razvoj genetike i nove tehnike poput molekularnog sata omogućili su novi pogled na ranu povijest vrste *Homo sapiens*. Problemi s korištenjem dijelova ljudskog genoma u ovakvim istraživanjima nagnali su znanstvenike da razmotre viruse kao alat za pronicanje u čovjekovu prošlost. U ovom radu nalazi se pregled problematike datiranja ljudskih migracija praćen kratkim uvod u strukturu HHV-1 i njegovu upotrebu u praćenju davnih ljudskih migracija.

## 7. SUMMARY

The origin of modern humans has been an object of human curiosity for centuries. Until recently radiographic and stratigraphic methods have been the only way of answering questions about the pathways and timelines of early human migrations.

Development of genetics and new techniques such as molecular clocks have enabled a new outlook upon the early history of *Homo sapiens*. Problems encountered while using parts of the human genome in such research drove scientists to consider viruses as a tool for elucidation of human history. This paper contains an overview of issues pertaining to dating of human migrations followed by a short introduction to the structure of human herpes virus 1 and its usage in tracking ancient human migrations.